

网络出版时间: 2021-4-2 17:13 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210402.1339.004.html>

HOTAIR 过表达慢病毒载体的构建及稳定细胞株的建立

李晓娟^{1,2}, 王 珏³, 何建萍⁴, 吕梦欣⁴, 钱 源^{1,3,4,5,6,7}

摘要 目的 构建稳定过表达 HOTAIR 的人滋养细胞 HTR-8/SVneo 细胞系,并验证 HOTAIR 的表达。方法 利用 PCR 技术扩增 HOTAIR 基因全长序列,并将其克隆入 LV5 载体中,构建 LV5-HOTAIR 载体,重组质粒经双酶切鉴定及测序验证成功后,转染人胚肾细胞 293T,包装过表达病毒颗粒,制备并浓缩慢病毒颗粒。将构建好的过表达 HOTAIR 慢病毒载体感染 HTR-8/SVneo 细胞,采用嘌呤霉素筛选出 HOTAIR 稳定表达的细胞系,荧光显微镜观察绿色荧光表达; qRT-PCR 验证 HOTAIR 表达。结果 重组质粒酶切得到的条带与预期相符,过表达 HOTAIR 慢病毒载体中序列与目标序列一致。荧光显微镜下过表达 HOTAIR 细胞有绿色荧光表达; qRT-PCR 结果表明过表达 HOTAIR 的 HTR-8/SVneo 稳定细胞株中 HOTAIR 表达是 Control 组的 206.3 倍 ($P < 0.05$),是 NC 组的 232.8 倍 ($P < 0.05$)。结论 成功建立稳定过表达 HOTAIR 的 HTR-8/SVneo 细胞,且过表达 HOTAIR 的 HTR-8/SVneo 稳定细胞株中 HOTAIR mRNA 表达水平明显升高。

关键词 HOTAIR; 慢病毒载体; HTR-8/SVneo; 子痫前期
中图分类号 R 714.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)05-0683-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.05.003

2020-09-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81760273, 81360103); 云南省科技计划项目(编号: 2017FB107); 云南省“万人计划”青年拔尖人才专项; 云南省卫生科技计划项目(编号: 2018NS0112); 昆明医科大学研究生创新基金项目(编号: 2019S119)

作者单位: ¹ 昆明医科大学第一附属医院产科, 昆明 650032

² 云南省第一人民医院产科, 昆明 650032

³ 昆明医科大学第一附属医院医学检验科产前诊断室, 昆明 650032

⁴ 昆明市妇幼保健院医学遗传与产前诊断科, 昆明 650032

⁵ 云南省检验医学重点实验室, 昆明 650032

⁶ 云南省实验诊断研究所, 昆明 650032

⁷ 云南省内设研究机构, 昆明 650032

作者简介: 李晓娟, 女, 硕士, 主治医师;

钱 源, 女, 博士, 副主任技师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yuanyuan2x@hotmail.com

子痫前期(preeclampsia, PE)是严重威胁母婴健康的妊娠期特有疾病,可引起全身多系统功能失调^[1]。研究^[2]表明其发病机制可能与胎盘缺氧及灌注不良密切相关。子宫螺旋动脉灌注不良可引起胎盘侵袭功能不足,胎盘灌注减少,继而导致 PE 的发生。长链非编码 RNA(long non-coding, lncRNA)虽不编码蛋白质但可通过转录后修饰和表观遗传修饰等方式参与基因表达调控,研究^[3]表明 lncRNA 与滋养细胞功能及胎盘分化、发育密切相关。目前已报道^[4] PE 胎盘中 IGF2/H19、MEG3、HOTAIR 等多种 lncRNA 异常表达。HOX 转录反义 RNA(HOX transcript antisense RNA, HOTAIR)是一种典型的 lncRNA,目前研究^[5-7]表明其可通过调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭等功能参与多种肿瘤的发生。但 HOTAIR 与 PE 的发病机制是否相关目前尚未阐明。

慢病毒是一类从人类免疫缺陷 I 型(human immunodeficiency type I, HIV-I)病毒上改造而成的病毒载体,属于逆转录病毒,其可将自身的病毒 RNA 逆转录为 DNA,并与宿主细胞染色体整合,达到目的基因在宿主细胞内长期、稳定表达的目的。与质粒及其他病毒载体相比,慢病毒具有感染效率高、转移基因片段容量大(10 kb 左右)、低免疫原性和低细胞毒性等优点,是携带目的基因的理想载体^[8-9]。该研究以慢病毒作为载体携带 HOTAIR 基因入 HTR-8/SVneo 细胞,以实现 HOTAIR 在人滋养细胞内持续稳定地表达。为进一步探讨 HOTAIR 在人滋养细胞中的作用及其分子机制提供有力的支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂 293T 细胞购自中国科学院细胞库, HTR-8/SVneo 细胞购自 BioVector 质粒载体菌种细胞基因保藏中心。胎牛血清(以色列 Biological Industries 公司), DMEM、RMPI-1640 培养基、胰酶 Trypsin-EDTA Solution、双抗(青链霉素)(美国 gibco 公司), HOTAIR 引物、RNAi-Mate 转染试剂(上海吉玛制药技术有限公司), Polybrene(德国 Sigma 公司)。NotI 和 BamHI、DNA 内切酶、DNA 连接

酶、DNA marker(加拿大 Fermentas 公司)。ClonExpress® Entry One Step Cloning Kit(南京诺唯赞生物科技有限公司),琼脂糖、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒(北京天根生化有限公司),中量抽提试剂盒(杭州爱思进生物技术有限公司)。10 cm 培养皿、96 孔板、50 ml 离心管(美国 Corning 公司)过滤器(德国 Sartorius Stedim 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HOTAIR 过表达重组慢病毒载体的构建及鉴定 根据 HOTAIR 基因全序列设计 PCR 引物并在上下游分别加上 NotI 和 BamHI 限制性内切酶酶切位点,同样方法设计无义序列 NC 组引物。通过 2 轮 PCR 反应获得目的基因相应的目的片段。片段利用 EcoRV 克隆到 pUC57 中,测序验证得到阳性克隆。并用 ClonExpress® Entry One Step Cloning Kit,将扩增好的片段重组克隆到线性化的 LV5 载体中。将连接产物转化感受态细胞,将转化后的菌液接种到 LB 琼脂培养基(含 50 mg/L 氨苄青霉素)上,37 °C 温箱倒置培养 16 h。挑取克隆菌落用质粒小提试剂盒抽提质粒并用 NotI 和 BamHI 对目的基因及 LV5 载体进行双酶切鉴定,对鉴定正确的质粒进行测序验证。测序比对正确的即为构建成功的目的基因表达质粒载体,将构建好的质粒载体进行超纯去内毒素抽提。

1.2.2 慢病毒包装、收集及滴度检测 将重组慢病毒质粒 LV5-HOTAIR 与穿梭质粒 A032 和包装质粒(pGag/Pol)经 RNAi-mate 共转染 293T 细胞,6 h 后换液,继续培养 72 h。将上清液 4 000 r/min,离心 4 min 后用 0.45 μm 过滤器过滤收集病毒浓缩液,通过荧光显微镜应用倍比稀释法检测病毒的滴度。

1.2.3 过表达 HOTAIR 慢病毒感染及稳定株筛选

选取 P3 ~ P6 代 HTR-8/Svneo 细胞,待细胞密度达到 50% 时,加入 HOTAIR 慢病毒载体。实验分组为 Control、HOTAIR-NC 及 HOTAIR 不同感染复数(MOI)组: HOTAIR-1、HOTAIR-2、HOTAIR-4、HOTAIR-8 组。转染 24 h 后换液,72 h 后荧光显微镜观察细胞中绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达情况并收集各组细胞用 qRT-PCR 检测 HOTAIR 表达水平,以确定病毒最佳感染复数。将 HOTAIR 组及 HOTAIR-NC 组慢病毒在最佳感染复数浓度下转染 HTR-8/Svneo 细胞,用含有终浓度为 1 μg/ml 嘌呤霉素(预实验筛选的最佳浓度)的培养基传代筛选 HOTAIR 稳定株,稳定株经传 3 代后荧光显微镜观察 GFP 的表达情况并收集细胞经 qRT-

PCR 检测 HOTAIR 表达情况。

1.2.4 qRT-PCR 检测 HOTAIR mRNA 的表达 用 TRIzol 收集细胞,提取总 RNA,用酶标仪 RNA 进行定量,琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性。以基因特异性引物进行 PCR 扩增,以 β-actin 作为内参。HOTAIR 引物序列: F: 5'-CAAACAGAGTCCGTTTCAGT-GTC-3'; R: 5'-TTCTTAAATTGGGCTGGGTC-3'。β-actin 引物序列: F: 5'-AAACGTGCTGCTGACCGAG-3'; R: 5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'。反应条件: 95 °C、3 min; 95 °C、12 s, 62 °C、40 s(40 个循环)。实验重复 3 次,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行基因表达的相对定量,确定过表达效率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 进行统计分析,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组慢病毒质粒鉴定 重组慢病毒质粒 LV5-HOTAIR 经 NotI 和 BamHI 双酶切后行琼脂糖凝胶电泳,结果重组质粒酶切后可观察到一条 2 000 ~ 2 500 bp 的目的条带(图 1),电泳结果与理论值 2 364 bp 相符。重组质粒送测序验证结果显示,重组质粒中插入的目的片段与 HOTAIR 基因序列完全一致,无碱基突变以及碱基插入、缺失等异常(图 2),表明 HOTAIR 慢病毒表达载体构建成功。

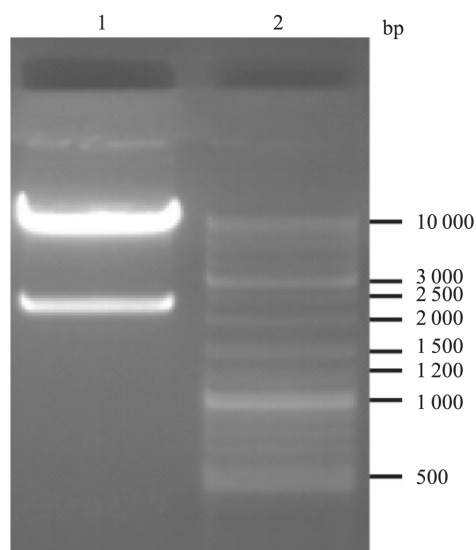


图 1 重组质粒 NotI 和 BamHI 双酶切鉴定图片

1: 重组质粒经 NotI 和 BamHI 双酶切后的产物; 2: 10 kb DNA Marker

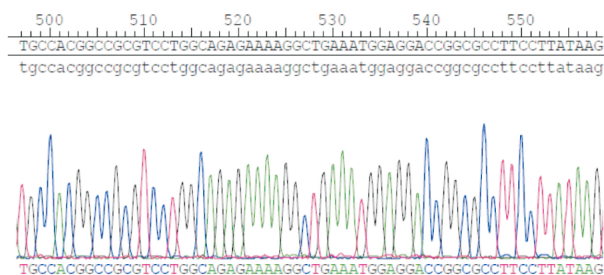


图2 重组慢病毒质粒 HOTAIR 插入片段的部分测序图谱

2.2 病毒滴度检测结果及荧光显微镜下绿色荧光表达情况 HOTAIR 慢病毒的滴度为 1×10^8 TU/ml, HOTAIR-NC 慢病毒的滴度为 2×10^8 TU/ml。转染慢病毒后的 HTR-8/Svneo 细胞用含有终浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素的培养基传代筛选 HOTAIR 稳定株, 嘌呤霉素筛选 3 代后细胞几乎无死亡现象, 表明剩余的细胞均是含有嘌呤抗性的细胞, 荧光显微镜下观察过表达 HOTAIR 组与 NC 组细胞均有绿色荧光表达(图 3)。

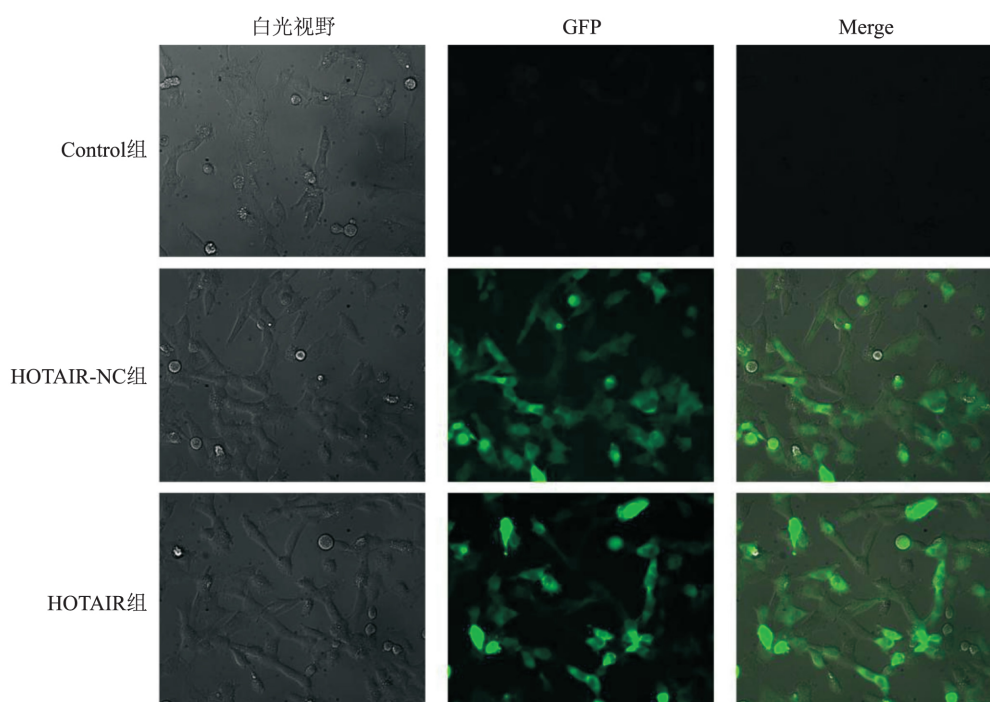
2.3 qRT-PCR 检测 HOTAIR 表达情况 qRT-PCR 检测结果表明: ① 不同感染复数的慢病毒转染 72 h 后, HOTAIR 组 HOTAIR 表达比 Control 组及 HOTAIR-NC 组均升高, MOI 为 4 时 HOTAIR 表达水平最高, 选择这个浓度为后续转染条件(图 4)。② 稳定转染 HOTAIR 组 HOTAIR 表达量是 Control 组的 206.3 倍($t = 196.9$, $P < 0.05$), 是 HOTAIR-NC

组的 232.8 倍($t = 197.6$, $P < 0.05$) HOTAIR 稳定高表达细胞株构建成功(图 5)。

3 讨论

PE 与胎盘功能障碍密切相关, 子宫螺旋动脉重铸不佳, 导致胎盘缺血, 进而促进血管活性因子的释放、血管内皮功能障碍引起 PE 的发生^[10]。可见胎盘功能障碍在 PE 发生发展中起重要作用。目前研究^[4, 11]表明 HOTAIR 在 PE 胎盘中表达异常, HOTAIR 与胎盘功能障碍密切相关。Mohammadpour-Gharehbagh et al^[12]发现母体外周血及胎盘 HOTAIR rs10783618 多态性变化可能增加 PE 易感性。Zhang et al^[13]发现 PUM1 与 HOTAIR 结合后降低 HOTAIR 的半衰期, 降低 HOTAIR 的稳定性, 通过转录后调控机制下调 HOTAIR 的表达抑制滋养细胞的侵袭能力参与 PE 的发生。但 HOTAIR 与 PE 发病机制的研究仍相对不足, 为进一步研究 HOTAIR 对滋养细胞功能影响及下游具体的机制, 本课题组构建了 HOTAIR 过表达载体, 通过慢病毒包装提高其转染效率, 并筛选出稳定高表达 HOTAIR 的 HTR-8/SVneo 细胞株。

此次研究只构建了 HOTAIR 过表达载体后续将进一步完善 HOTAIR 抑制载体的构建。下一步拟探讨 HOTAIR 对滋养细胞功能的影响, 及对胎盘功能相关信号通路的影响。本实验成功构建了 HOTAIR

图3 荧光显微镜下观察稳定转染 HOTAIR、HOTAIR-NC 慢病毒的 HTR-8/Svneo 细胞 $\times 200$

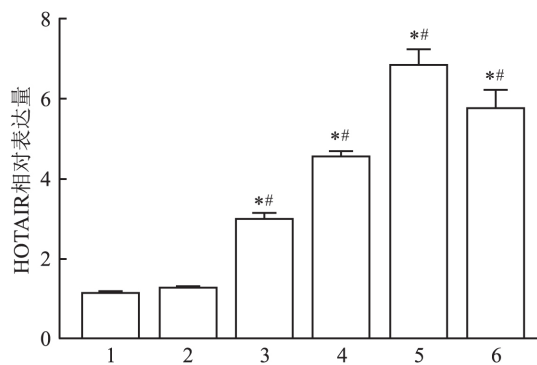


图4 qRT-PCR检测不同感染复数 HOTAIR 慢病毒转染 HTR-8/Svneo 细胞后 HOTAIR 表达水平

1: Control 组; 2: HOTAIR-NC 组; 3: HOTAIR-1 组; 4: HOTAIR-2 组; 5: HOTAIR-4 组; 6: HOTAIR-8 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 HOTAIR-NC 组比较: # $P < 0.05$

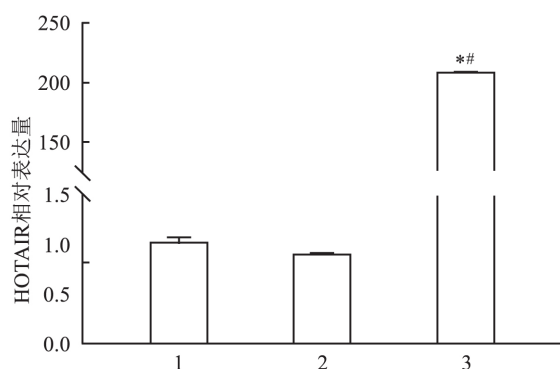


图5 qRT-PCR检测 HOTAIR 慢病毒稳定转染 HTR-8/Svneo 细胞中 HOTAIR 表达水平

1: Control 组; 2: HOTAIR-NC 组; 3: HOTAIR 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 HOTAIR-NC 组比较: # $P < 0.05$

慢病毒过表达载体,为后续细胞功能学实验提供良好基础,也为进一步研究提供可行性。为进一步探讨 HOTAIR 功能及其在 PE 发生、发展中的作用和机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Ramírez-Montero C, Lima-Gómez V, Anguiano-Robledo L, et al. Preeclampsia as predisposing factor for hypertensive retinopathy: participation by the RAAS and angiogenic factors [J]. *Exp Eye Res* 2020, 193: 107981.
- [2] Avila-Ramírez M A, Esteban-Martínez R L, López-Moctezuma E, et al. (Pro) renin/renin receptor expression during normal and preeclamptic pregnancy in rats [J]. *Life Sci*, 2019, 216: 22–8.
- [3] McAninch D, Roberts C T, Bianco-Miotto T. Mechanistic Insight into Long Noncoding RNAs and the Placenta [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7).
- [4] Song X J, Luo X C, Gao Q S, et al. Dysregulation of lncRNAs in placenta and pathogenesis of preeclampsia [J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(10): 1165–70.
- [5] Qu X, Alsager S, Zhuo Y, et al. HOX transcript antisense RNA (HOTAIR) in cancer [J]. *Cancer Lett* 2019, 454: 90–7.
- [6] 陈玲琳,熊术道,高申孟. HOTAIR 在急性髓细胞性白血病中的表达及其对柔红霉素耐药的作用机制 [J]. *安徽医科大学学报* 2020, 55(11): 1676–80.
- [7] 梁栋国,王雅婷,罗睿宇等. HOTAIR 与前列腺癌的研究进展 [J]. *安徽医科大学学报* 2019, 54(1): 163–7.
- [8] Mátrai J, Chuah M K L, VandenDriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(3): 477–90.
- [9] Oldham R A, Bernstein E M, Medin J A. Lentiviral vectors in cancer immunotherapy [J]. *Immunotherapy* 2015, 7(3): 271–84.
- [10] Roberts J M, Hubel C A. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme [J]. *Placenta* 2009, 30 Suppl A: S32–7.
- [11] 邹艳芬,孙丽洲. 长链非编码 RNA HOTAIR 调节 PE 滋养细胞功能的研究 [J]. *四川大学学报(医学版)* 2015, 46(1): 113–7.
- [12] Mohammadpour – Gharehbagh A, Jahantigh D, Saravani M, et al. Impact of HOTAIR variants on preeclampsia susceptibility based on blood and placenta and in silico analysis [J]. *IUBMB life* 2019, 71(9): 1367–81.
- [13] Zhang Y, He X Y, Qin S, et al. Upregulation of PUM1 expression in preeclampsia impairs trophoblast invasion by negatively regulating the expression of the lncRNA HOTAIR [J]. *Mol Ther* 2020, 28(2): 631–41.

Construction of HOTAIR overexpression lentivirus vector and establishment of stable cell lines

Li Xiaojuan^{1,2}, Wang Jue³, He Jianping⁴, et al

(¹Obstetrics Dept of The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032; ²Obstetrics Dept of The First People's Hospital of Yunnan Province Kunming 650032; ³Prenatal Diagnosis Room of Medical Laboratory of The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032; ⁴Obstetrics Dept of The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032)

Abstract Objective To establish a stable human trophoblast cell line HTR –8 / SVneo with overexpression of

网络出版时间: 2021-4-6 10:17 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20210402.1339.005.html>

Ghrelin 受体拮抗剂(D-Lys³)-GHRP-6 减轻肥胖小鼠的脂肪炎症和氧化应激

孟栋栋 魏凯迪 侯静文 吴丽娜 马晓君

摘要 目的 探讨 Ghrelin 受体拮抗剂(D-Lys³)-GHRP-6 对高脂饮食(HFD) 诱导的肥胖小鼠的脂肪炎症和氧化应激的改善作用及机制。方法 4 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为常规饮食(RD)、高脂饮食(HFD) 和 HFD + (D-Lys³)-GHRP-6 组。饲养 16 周后分析各组小鼠的体质量、体脂率和体脂成分, 收集各组小鼠的血液和脂肪组织。酶联免疫吸附法检测小鼠单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 IL-10。HE 染色评估脂肪细胞直径及脂滴水平。免疫荧光染色及流式细胞术分析脂肪组织血管基质成分(SVF) 巨噬细胞的数量及表型。检测各组血清中总超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、黄嘌呤氧化酶(XO)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、黄嘌呤脱氢酶(XDH) 的活性。结果 HFD 组小鼠体质量、体脂率、附睾白色脂肪组织(eWAT)、皮下白色脂肪组织(sWAT)、肩胛间脂肪组织(iBAT) 及脂肪细胞直径、iBAT 脂滴水平均较 RD 组显著升高($P < 0.05$); 但在 HFD + (D-Lys³)-GHRP-6 组上述指标较 HFD 组均有明显下降($P < 0.05$)。与 HFD 组相比, HFD + (D-Lys³)-GHRP-6 组血清

IL-6、TNF- α 、MCP-1 及 MDA、XO 和 XDH 活性均明显下降, 而 IL-10 及 SOD、CAT 和 GPx 活性均升高($P < 0.05$); 并且 eWAT 组织冠状结构(CLS) 数、SVF 中巨噬细胞总数、巨噬细胞 M1 表型下降而 M2 表型升高($P < 0.05$)。结论 (D-Lys³)-GHRP-6 可能通过抑制促炎性巨噬细胞募集并加速其 M1 表型向 M2 表型转换和维持氧化应激平衡来缓解 HFD 诱导的肥胖和脂肪炎症。

关键词 高脂饮食; Ghrelin; (D-Lys³)-GHRP-6; 脂肪炎症; 氧化应激; 巨噬细胞极化

中图分类号 R 364.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)05-0687-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.05.004

肥胖症是一种以营养过剩导致的过度脂肪沉积为特征的慢性代谢炎症性疾病, 其能引起胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、非酒精性肝病、心血管疾病和 2 型糖尿病等多种并发症^[1-2]。饥饿激素(Ghrelin) 是一种能促进生长、食欲和调节能量的生长激素释放肽, 也是肥胖的关键调节因子之一^[3-4]。虽然, 肥胖症的发病因素众多, 但过度膳食高脂肪食物是大部分肥胖症的直接原因^[5]。因此, 该研究采用高脂饮食(high fat diet, HFD) 诱导的肥胖小鼠模型, 观察 Ghrelin 受体拮抗剂(D-Lys³)-生长激素释放肽

2021-01-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81400800)

作者单位: 郑州大学第一附属医院内分泌及代谢病科, 郑州 450052

作者简介: 孟栋栋, 女, 副主任医师;

马晓君, 女, 副主任医师, 责任作者, E-mail: 7359398@qq.com

HOTAIR and to verify the expression of HOTAIR. **Methods** PCR was used to amplify the full length sequence of HOTAIR gene and clone it into LV5 vector. LV5-HOTAIR vector was constructed. The recombinant plasmid was identified by double enzyme digestion and verified by sequencing. The constructed overexpressed HOTAIR lentivirus vector was infected with HTR-8/SVneo cells, and the cell lines with stable expression of HOTAIR were screened by purinomycin, and the level of GFP expression was observed by fluorescence microscope. qRT-PCR verified the expression of HOTAIR. **Results** The bands obtained by recombinant plasmid digestion were consistent with the expectation, and the sequences of overexpressed HOTAIR lentivirus vectors were consistent with the target sequences. Under fluorescence microscope, the cells in the overexpressed HOTAIR group showed green fluorescence expression. qRT-PCR results showed that the HOTAIR expression in HTR-8/Svneo stable cell lines with overexpression of HOTAIR was 206.3 times higher than that in the Control group ($P < 0.05$) and 232.8 times higher than that in the NC group ($P < 0.05$). **Conclusion** The stable HOTAIR-overexpressed HTR-8/SVneo cells were successfully established, and the expression level of HOTAIR mRNA significantly increased in the stable HOTAIR-overexpressed HTR-8/SVneo cell lines.

Key words HOTAIR; lentiviral vector; HTR-8/Svneo; preeclampsia